

DE-2148

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3525678 A1

⑤1 Int. Cl. 4:
C07H 21/00

②1 Aktenzeichen: P 35 25 678.8
②2 Anmeldetag: 18. 7. 85
④3 Offenlegungstag: 30. 1. 86

Behördenamt

DE 3525678 A1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
20.07.84 JP 59-149642

⑦1 Anmelder:
Nippon Zeon Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦4 Vertreter:
Ritter von Raffay, V., Dipl.-Ing.; Fleck, T.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 2000 Hamburg; Boeters, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anw., 8000 München

⑦2 Erfinder:
Niina, Akihiko, Yokohama, Kanagawa, JP;
Kamimoto, Harumi, Kamakura, Kanagawa, JP

⑤4 Polynucleotid-Syntheseapparat

Die Erfindung betrifft einen Polynucleotid-Syntheseapparat, in dem Nucleotid-Reagenzien, Reaktionsstoffe, Lösungsmittel und dergleichen, die zur Polynucleotid-Synthese notwendig sind, in einen Reaktor mittels Flüssigkeitsbeschickungs- und Entleerungsmitteln, die durch Steuerungsmittel gesteuert werden, eingeführt und daraus entfernt werden, der dadurch gekennzeichnet ist, daß das Steuerungsmittel eine programmierbare Steuervorrichtung umfaßt, mit einer Speichereinheit, in der die Nachschubmenge und die Nachschub- und Entleerungssequenz der Reagenzien, Lösungsmittel und dergleichen gespeichert sind, wobei die Flüssigkeitsnachschub- und Entleerungsmittel entsprechend den in der Speichereinheit gespeicherten Inhalten gesteuert werden.

DE 3525678 A1

RAFFAY, FLECK & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

POSTFACH 32 32 17

D-2000 HAMBURG 13

16. Juli 1985

3525678

Nippon Zeon Co. Ltd.

6-1, Marunouchi 2 chome,

Chiyoda-ku,

Tokyo 100, Japan

DIPL.-ING. VINCENZ V. RAFFAY
DIPL.-CHEM. DR. THOMAS FLECK
HAMBURG

DIPL.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DIPL.-ING. ROBERT BAUER
MÜNCHEN

KANZLEI:
GEFFCKENSTRASSE 6
TELEFON: (040) 47 80 23
TELEGRAMME: PATFAY, HAMBURG
TELEX 2 164 631 paty d

UNSERE AKTE:

2580/10

Polynucleotid-Syntheseapparat

Patentansprüche

1. Polynucleotid-Syntheseapparat gekennzeichnet durch einen Speicherabschnitt, um strömungsfähige bzw. fluide Chemikalien, einschließlich Rohmaterialien, Reagenzien, Lösungsmittel und dergleichen, aufzunehmen, die zur Polynucleotid-Synthese erforderlich sind, einen Reaktor zur Synthetisierung dieser Rohmaterialien darin, Fluidnachschieb- und Entleerungsmittel, um die fluiden Chemikalien in den Speicherabschnitt zum Reaktor zu liefern und die Reagenzien und die Lösungsmittel aus dem Reaktor zu entfernen, sowie Steuerungsmittel zur Steuerung der Fluidnachschieb- und Entleerungsmittel, wobei die Steuerungsmittel eine programmierbare Steuervorrichtung umfassen, einschließlich einer Speichereinheit, in welcher die Nachschubmenge und die Nachschub/Entleerungssequenz der fluiden Chemikalien gespeichert sind, und wobei die Fluidnachschieb- und Entleerungsmittel entsprechend dem

3525678

in der Speichereinheit gespeicherten Inhalten gesteuert werden.

2. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die porgrammierbare Steuervorrichtung mit einer Eingabeeinheit für die Grundmassenreihenfolge bzw. Basensequenz verbunden ist, die die Nachschubreihenfolge der Rohmaterialien bestimmt, und daß die Fluidnachschieb- und Entleerungsmittel in Übereinstimmung mit den in der Speichereinheit gespeicherten Inhalten und den festgelegten Inhalten der Eingabeeinheit für die Basensequenz gesteuert werden.

3. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Adressierungsanzeige vorgesehen ist, die eine Position von einem Synthese initiiierenden Ende des Nucleotids darstellt, sowie eine Vielzahl von Anzeigelampen für die Grundmassen bzw. Basen, die die Art der entsprechenden Basen des Nucleotids anzeigt, und daß eine Steuereinheit vorgesehen ist, die die Adressierungsanzeige und die Anzeigelampen für die Basen ansprechend auf die Daten für die Basensequenz in der Speichereinheit steuert.

4. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Speicherabschnitt eine Vielzahl an Lösungsmittelflaschen und Reagenz- bzw. Reaktionsstoffflaschen umfaßt, die die entsprechenden Lösungsmittel bzw. Reagenzien enthalten, wobei jede Lösungsmittelflasche eine Leitung an ihrer Inertgas-einlaßseite besitzt, wobei die Leitung jeder Lösungsmittelflasche und jeder Reagenzflasche mit einem Rückstromventil versehen ist, welches eine Gegenströmung in andere Lösungsmittel- oder Reagenzflaschen verhindert.

3525678

5. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktor einen Reaktorkörper besitzt, an dessen oberen und unteren Seiten Filter vorgesehen sind, und daß auf einem Träger Rohmaterialien aufgebracht sind, die zwischen den Filtern angeordnet wird, wobei ein nicht-klebender Teil entlang der Außenumfangskante der Filter an der oberen Seite vorgesehen ist, um zu verhindern, daß der Träger an den Filtern festhaftet.

6. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Solenoidventil an der entsprechenden Leitung des Einlasses und des Auslasses des Reaktors vorgesehen ist, und daß das Solenoid bzw. Hubmagnetventil einen Ventilkörper umfaßt, der mit einer Ventilöffnung versehen ist, die mit der anderen Öffnung an einem Kommunikationsraum kommuniziert, der mit einer Vielzahl von Öffnungen und einer Ventilstange in Verbindung steht, die die Ventilöffnung ansprechend auf einen Kolben des Solenoids öffnet und schließt.

7. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste (Auslaß-)Öffnung, eine zweite (Einlaß-)Öffnung und eine dritte Öffnung die mit der Auslaßseite des Speicherabschnitts verbunden ist, am Außenumfang des Solenoidventilkörpers in einem vorbestimmten Winkel vorgesehen sind, und daß die erste und zweite Öffnung normalerweise miteinander in Verbindung stehen, während die dritten Öffnungen mit der ersten und zweiten Öffnung in Verbindung stehen, wenn sie erregt sind, wobei die erste und zweite Öffnung derart angeordnet sind, daß sie in einer niedrigeren Stellung und benachbart zueinander angeordnet sind, und wobei die erste Öffnung mit der zweiten Öffnung über ein

Rohr derart kommuniziert, daß die Achse der ersten Öffnung und die Achse der zweiten angrenzenden Öffnung zur ersten Öffnung in Bezug zur vertikalen Achse (oder horizontalen Achse) geneigt sind.

8. Polynucleotid-Syntheseapparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Memoryansammlung (memory pack) vorgesehen ist, die einen Halbleiterspeicher, wie z.B. ROM, PROM, EPROM umfaßt, in dem das Steuerprogramm und/oder Wartungsprogramm gespeichert ist, so daß die Memory- bzw. Datenansammlung mit bzw. in der Speichereinheit der programmierbaren Steuervorrichtung austausch- bzw. ersetzbar ist.

3525678

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Polynucleotid-Syntheseapparat, der zur Synthese von Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Ribonucleinsäure (RNA) und dergleichen verwendet wird.

Ein Verfahren zur Synthetisierung von DNA unter Verwendung eines Trägers, an den das Nucleosid chemisch gebunden ist, und anschließender Kondensation des Nucleotids unter Verwendung von Phosphit-, Triesterphosphit und Diesterphosphit-Verfahren ist gut bekannt. In diesen Syntheseverfahren werden die Stufen des Waschens, des Schutzentzuges, des Waschens, der Kondensationsreaktion, des Waschens und dergleichen wiederholt. Dementsprechend ist die Anzahl der Wiederholungen hoch und der Verfahrensablauf ist mühselig trotz der geringen Anzahl der Stufen. Vor kurzem sind verschiedenartige automatische DNA-Syntheseapparate vorgeschlagen worden, um die Komplexität des Synthesebetriebs zu eliminieren.

Die automatischen DNA-Syntheseapparate, die bisher vorgeschlagen worden sind, werden mittels eines Mikrocomputers gesteuert, der ein 128 bis 512 k bit-Memorysystem und ein 128 bis 512 k bit-Anwendungsmemory besitzt. Es wird keine Sequenz-Steuervorrichtung zur Steuerung des vorgeschlagenen Polynucleotid-Syntheseapparates eingesetzt. Man hat angenommen, daß dies für eine Sequenzsteuerung des Standes der Technik unmöglich sei, die Steuerung des automatischen DNA-Syntheseapparates durchzuführen, die durch eine kompakte und wirtschaftliche programmierbare Steuervorrichtung erreicht wird, und wobei die programmierbare Steuervorrichtung, die eine überlegene Steuerung möglich macht, den Syntheseapparat voluminöser bzw. sperriger und teurer macht, als den Syntheseapparat, der einen Mikrocomputer verwendet. Deshalb sind keine Anstrengungen für einen praktischen

3525678

Betrieb unternommen worden.

Da die Entfernung eines Gehäuses zum Einbau der Steuervorrichtung unter Verwendung des eben erwähnten vielseitigen Mikrocomputers in den Syntheseapparat einen Einfluß auf die Verlässlichkeit etc. hat, sollte die Steuervorrichtung auf dem Gehäuse des Syntheseapparates befestigt werden. Das Gehäuse des Gesamtapparates wird hierdurch sperriger bzw. voluminöser. Eine Schnittstelle zur Verbindung des Mikrocomputers mit dem Syntheseapparat, den Relaisvorrichtungen zur Steuerung der Flüssigkeitszufuhr- und Entleerungsmittel, der schalldämpfenden Vorrichtung und dem Antriebsregulator etc. werden benötigt. Außerdem führen die speziellen Anforderungen dieser Schnittflächen zu hohen Kosten.

Obwohl die Kontrollvorrichtung unter Verwendung einer entsprechenden PC-Schaltkonsole es möglich macht, daß der gesamte Apparat kompakt wird, sollte die Schaltkonsole selbst besonders aufgebaut sein, wobei die eben erwähnte Schnittstelle benötigt wird, wodurch hohe Kosten auftreten. Forschungs- und Entwicklungskosten treten immer dann auf, wenn die PC-Schaltkonsole selbst zur Modifizierung des Programms verändert werden soll.

Mit anderen Worten, die Verwendung des Mikrocomputers als Steuervorrichtung macht im Hinblick auf die Bequemlichkeit durch den Mikrocomputer nicht nur den Syntheseapparat voluminöser und teurer, sondern erfordert auch einen überlegenen, d.h. unnötig komplizierten, besonderen Betrieb des Computers.

Die vorliegende Erfindung wurde unter den oben genannten Umständen gemacht. Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen automatischen Polynucleotid-

3525678

Syntheseapparat zu schaffen, wobei auf die Verringerung seiner Größe und Kosten, sowie auf eine Verbesserung in der Betriebsfähigkeit gezielt wurde.

Die kürzliche Entwicklung von Sequenz- Steuervorrichtungen ist schnell und drastisch. Rotationstrommel-, Schaltbrett-, Kontaktmikrorelais-, und kontaktlose sog. solid state-artige Sequenzsteuervorrichtungen sind nacheinander entwickelt worden. Man hat gedacht, daß speicherprogrammartige oder programmierbare Steuervorrichtungen, bei denen der Benutzer der Sequenzsteuervorrichtung das Programm erstellt hat, altmodischer im Vergleich zur Steuerung unter Verwendung eines Mikrocomputers sind. Es sind jedoch programmierbare Steuervorrichtungen mit 32 bis 96 k bit Memory- und 2 bis 32 k bit Arbeitsspeicher kürzlich entwickelt worden. Die Erfinder haben deshalb Überlegungen angestellt, eine bisher nicht vorgeschlagene programmierbare Steuervorrichtung als Hauptsteuerung mit IC, LSI, RAM und ROM und dergl. einzubauen, die größenmäßig kompakt ist und im gespeicherten Programm leicht verändert werden kann und an eine überlegene Sequenzsteuerung angepaßt ist. Als Ergebnis wurde die vorliegende Erfindung gemacht, in der die oben erwähnten Probleme durch Verwendung einer programmierbaren Steuervorrichtung gelöst worden sind.

D.h., die vorliegende Erfindung liegt in einem Polynucleotid-Syntheseapparat, der gekennzeichnet ist durch einen Speicherabschnitt, um strömungsfähige bzw. fluide Chemikalien, einschließlich Rohmaterialien, Reagenzien, Lösungsmittel und dergleichen, aufzubewahren, die zur Polynucleotid-Synthese erforderlich sind, einen Reaktor zur Synthetisierung dieser Rohmaterialien darin, Fluidnachschieb- und Entleerungsmittel, um die fluiden Chemikalien in den Speicherabschnitt zum Reaktor

zu liefern und die Reagenzien und die Lösungsmittel aus dem Reaktor zu entfernen, sowie Steuerungsmittel zur Steuerung der Fluidnachschieb- und- Entleerungsmittel, wobei die Steuerungsmittel eine programmierbare Steuervorrichtung umfassen, einschließlich einer Speichereinheit, in welcher die Nachschubmenge und die Nachschub/Entleerungssequenz der fluiden Chemikalien gespeichert sind, und wobei die Fluidnachschieb- und- Entleerungsmittel entsprechend dem in der Speichereinheit gespeicherten Inhalten gesteuert werden. Die programmierbare Steuervorrichtung ist mit einer Eingabeeinheit für die Basensequenz verbunden, die die Nachschubreihenfolge des Rohmaterials festlegt. Die Flüssigkeitsnachschieb- und- Entleerungsmittel werden in Übereinstimmung mit den in der Speichereinheit gespeicherten Inhalten bzw. Angaben und den festgelegten Angaben der Eingabeeinheit für die Basensequenz gesteuert.

Erfindungsgemäß werden keine Schnittstellen benötigt und der Einbau der auf dem Gehäuse befestigten Steuervorrichtung ist nicht notwendig, wodurch eine Reduzierung hinsichtlich Kosten und Größe des Gesamtapparates möglich wurde. Außerdem können die gesteuerten Inhalte bzw. Angaben leicht dadurch verändert werden, daß die gespeicherten Angaben in der Speichereinheit oder die festgelegten Angaben in der Eingabeeinheit für die Basensequenz verändert werden, wodurch die Betriebsfähigkeit verbessert wird.

Da die programmierbare Steuervorrichtung durch eine dafür ausgerichtete Sprache gesteuert wird, macht sie es möglich, einen kompakten und wirtschaftlichen, überlegenen DNA-Syntheseapparat zu schaffen, der eine programmierbare Steuervorrichtung verwendet, die im

3525678

Vergleich zum Mikroprozessor als konventioneller angesehen worden ist. IC's, wie z.B. 8061, 8085, 6008 und dergleichen können als CPU (Zentralverarbeitungseinheit) verwendet werden. 32 bis 96 k bit ROM, PROM werden als Systemmemory bevorzugt. 2 bis 32 k bit ROM, PROM und EPROM werden vorzugsweise als Arbeitsspeicher verwendet. Die Verwendung einer Floppydisk (Diskette) oder eines Magnetbandes an sich als Arbeitsspeicher oder Systemmemory wird nicht bevorzugt. Ein Timer/Zähler der etwa 30 bis 200 besitzt, wird bevorzugt. Eingangs-/Ausgangsmarkierungen liegen vorzugsweise zwischen 20 bis 64 insgesamt. Innenrelais, die keine IC, LSC, einschließlich Relaiskontakten verwenden, werden nicht bevorzugt.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung mittels eines Ausführungsbeispieles unter Bezugnahme auf die Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigt:

- Fig. 1 ein schematisches Diagramm, das in seiner Gesamtheit den erfindungsgemäßen Apparat zeigt;
- Fig. 2 ein Verdrahtungsdiagramm, das eine periphere Schaltung einer programmierbaren Steuervorrichtung zeigt;
- Fig. 3 ein Fließdiagramm, das den Betrieb der erfindungsgemäßen Vorrichtung zeigt;
- Fig. 4 ein Fließdiagramm, daß die Kondensationsstufe im Detail zeigt;
- Fig. 5a eine Frontansicht, die teilweise weggeschnitten ist, und ein Solenoidventil zeigt;
- Fig. 5b eine Schnittansicht, die den Ventilkörper zeigt,

3525678

Fig. 6 eine schematische Ansicht, die ein weiteres Beispiel der Eingabeeinheit für die Basen zeigt;

Fig. 7 eine Frontansicht, die die Eingabe- und Anzeigeeinheiten des Mikroprozessors zeigt;

Fig. 8 eine Querschnittsansicht, die einen Filter zeigt; und

Fig. 9a schematische Ansichten, die die und 9b Anordnungen und Verbindungen der Solenoidventile zeigen.

Fig. 1 ist ein schematisches Diagramm, das eine Ausführungsform eines Polynucleotid-Syntheseapparates der vorliegenden Erfindung zeigt. Fig. 2 ist ein schematisches Diagramm, das ein Steuermittel im Detail zeigt. In den Zeichnungen stellt das Bezugszeichen 1 einen Inertgas (Stickstoff)-Zylinder, 2 eine Lösungsmittelflasche, 3 bis 6 Reagenzflaschen, 7 bis 10 Flaschen, die Rohmaterialien, einschließlich Nucleotidreagenzien enthalten, 11 einen Reaktor und 12 ein Steuermittel dar. Der genannte Inertgaszylinder 1 und die Flaschen 2 bis 10 bilden einen Speicherabschnitt zur Aufbewahrung der fluiden Chemikalien, einschließlich Rohmaterialien, Reaktionsstoffe bzw. Reagenzien, Lösungsmittel und dergleichen.

N₂-Gas im Stickstoffzylinder 1 wird in die Lösungsmittelflasche 2, die Reagenzienflaschen 3 bis 6 und die Rohmaterialflaschen 7 bis 10 über ein Regulierventil 13 und die Leitung 14 eingeführt, so daß die Lösungsmittel, Reagenzien und Rohmaterialien dem Reaktor 11 von der Lösungsmittelflasche 2, den Reagenzienflaschen 3 bis 6, den Rohmaterialienflaschen 7 bis 10 entsprechend unter

3525678

Druck des N_2 -Gases zugeführt werden. N_2 -Gas wird ebenfalls über die Öffnung 15 in den Reaktor 11 eingeführt. Das N_2 -Gas ist durch ein Trocknungsmittel, wie z.B. Calciumchlorid oder dergleichen, getrocknet worden. Die Reagenzflaschen 3, 4, 5 und 6 sind mit Detrityl, Oxidations- bzw. Kappungs- bzw. Kondensationsmittel entsprechend beladen. Die Rohmaterialflaschen 7, 8, 9 und 10 sind mit dem Nucleotidreagenz/Lösungsmittellösung beladen, die entsprechend Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) als Base beladen.

Rückschlagventile 16, 17 und 18 werden an den Einlässen der Reagenzflaschen 3, 4 und 5 vorgesehen, um zu verhindern, daß Dampf und Nebel von Detrityl, Oxidations- und Kappungsmittel durch Gegenstrom über die Leitung in die anderen Flaschen gelangt bzw. fließt. Dieses wird durchgeführt, da ein Vermischen der Dämpfe bzw. Nebel von Detrityl, Oxidations- und Kappungsmitteln, mit anderen Reagenzien, Lösungsmittel und Nucleotidsreagenzien deren Funktion beeinträchtigt.

Eine Ausführungsform des Reaktors wird unter Bezugnahme auf Fig. 8 beschrieben.

Der Reaktorkörper 11 besteht aus klarem oder durchsichtigem synthetischem Harz oder Glas, wobei die Innenfläche der Silanbildung (Silanigation) unterworfen ist. Der Körper 11 ist mit abgesetzten Teilen 11a und 11b an den Öffnungen seines oberen bzw. unteren Endes versehen.

Ein oberer und unterer Stopfen 62 und 63 wird in die obere bzw. untere Endöffnung eingesetzt. Filter 64a und

3525678

64 b werden zwischen dem oberen und unteren Stopfen 62 und 63 und den entsprechenden abgestuften Teilen 11a und 11b eingesetzt. Diese Filter 64a und 64b können den Träger der im Reaktorkörper 11 eingesetzt ist, einschließen und sind derart ausgebildet, daß sie in den Reagenzien und Lösungsmitteln unlöslich sind, die zur Polynucleotid-Synthesereaktion erforderlich sind.

An der Seite des oberen Stopfens 62 (oder an der Spitze des Reaktors) wird ein nicht klebendes Blatt 65, das glatte Flächen nichtklebenden Materials besitzt, z.B. ein Fluoro-Harz (typischerweise Äthylentetrafluorid), zwischen die Filter 64a und den abgestuften Teil 11a gelegt. Dieses nichtklebende Blatt 65 ist mittig mit einem Loch 65a versehen, so daß das Blatt die Umfangskante des Filters 64a bedeckt.

In Übereinstimmung mit der bisher beschriebenen Ausführungsform, wenn die Reagenzien oder Lösungsmittel, die in den Reaktorkörper 11 über die Leitung 63a des unteren Stopfens 63 eingeführt worden sind und den Körper 11 überströmen, wird der Träger im Reaktorkörper 11 nach oben treiben und gegen den Filter 64a gedrückt. Zu diesem Zeitpunkt besitzen die Träger die Tendenz, sich auf dem Filter 64 abzulagern, während das nichthaftende bzw. nichtklebende Blatt 65 diese Tendenz verhindert. Dementsprechend wird der Träger lediglich am mittigen Bereich des Filters 64a anhaften, der nicht mit dem nichtklebenden Blatt 65 abgedeckt ist, so daß nicht befürchtet werden muß, daß der Träger auf dem inneren Umfangsteil des Körpers 11 anhaftet.

Wenn die Reagenzien mit höheren spezifischen Gewicht in den Körper 11 über die Leitung bzw. den Kanal 63a des unteren Stopfens 63 eingeführt sind, wird der Träger

3525678

ebenfalls nach oben treiben und wird gegen den Filter 64a gedrückt, während das Anhaften am Filter 64a auf ähnliche Weise verhindert wird.

Obwohl die eben erwähnte Ausführungsform zeigt, daß die Umfangskante des Filters 64a mit einem nichtklebenden Blatt 65 abgedeckt wird, kann der Filter integral mit einer nichtklebenden Schicht an seiner Umfangskante ausgebildet werden.

Ein Solenoidventil 19 wird an der Leitung 14 vorgesehen. Solenoidventile 20 bis 28 sind am entsprechenden Auslaß der Flaschen 2 bis 10 vorgesehen.

Solenoidventile 29, 30, 31 und 31' sind an den unteren und oberen Seiten des Reaktors 11 vorgesehen. Die Ventile 19 bis 31' werden zum Öffnen und Schließen mittels des schon erwähnten Steuermittels 12 gesteuert.

Das Solenoidventil 19 ist ein Zweiwegeventil und wird geöffnet, wenn der Solenoid- bzw. Hubmagnet (nicht gezeigt) erregt ist und wird durch die Beaufschlagungskraft einer Feder (nicht gezeigt) geschlossen, wenn er nicht erregt ist. Der Aufbau des Solenoidventils 19 ist identisch zum Dreiwegeventil der Fig. 5, abgesehen davon, daß die Öffnung 205 wegfällt.

Die Solenoidventile 20 bis 28 sind Dreiwegeventile und besitzen einen identischen Aufbau. Das Solenoidventil 20 wird detailliert in den Figuren 5a und 5 b gezeigt.

Das Solenoidventil 20 umfaßt einen Ventilkörper 200 und

3525678

eine Ventilstange 203, die von einem Hubmagneten 201 und einem Diaphragma 202 getragen wird. Der Ventilkörper 200 ist mit den Öffnungen 204 und 205 versehen, die normalerweise geöffnet sind, sowie einer Öffnung 206, die mit den Öffnungen 204 nur dann kommuniziert, wenn der Hubmagnet erregt ist.

Wenn der Hubmagnet 201 erregt ist, wird die Ventilstange 203 gegen die Beaufschlagungskraft der Feder 207 zurückgezogen, so daß die Öffnungen 204, 205 und 206 miteinander kommunizieren. Wenn er nicht erregt ist, erstreckt sich die Ventilstange durch eine Beaufschlagungskraft der Feder 207, um die Kommunikation zwischen den Öffnungen 204, 205 und 206 zu unterbrechen.

Die Öffnung 206 kommuniziert mit dem Auslaß der Lösungsmittelflasche 2, wie es in unterbrochener Linie der Fig. 1 gezeigt wird. Die normalerweise kommunizierenden Öffnungen 204 und 205 kommunizieren mit den Öffnungen der anderen Solenoidventile 21 bis 28, die normalerweise geöffnet sind (vgl. die durchgehende Linie in Fig. 1). N₂-Gas, Lösungsmittel und dergl. werden zum Reaktor 11 über die normalerweise geöffneten Öffnungen der entsprechenden Solenoidventile 20 bis 28 zugeführt.

Die Solenoidventile 29, 30, 31 und 31' sind Dreiwegeventile und besitzen einen identischen Aufbau. Diese Ventile sind in eine Position geschaltet, die in gestrichelter Linie in Fig. 1 gezeigt ist, wenn der nicht gezeigte Hubmagnet erregt ist, während sie die Stellung in durchgehender Linie in Fig. 1 einnehmen, wenn er nicht erregt ist.

3525678

Die Verbindung der Solenoidventile, jeweils am Auslaß der entsprechenden Flaschen, wird im folgenden beschrieben. Die schon erwähnte, erste, zweite und dritte Öffnung 204, 205 und 206 (die am Auslaß der Flaschen verbunden sind), sind am Außenumfang des Ventilkörpers des Solenoidventils in einer vorgegebenen winkelförmigen Beziehung angeordnet. Die erste Öffnung kommuniziert normalerweise mit der zweiten Öffnung. Die dritte Öffnung steht normalerweise mit der ersten und zweiten Öffnung in Verbindung. Die erste und zweite Öffnung der entsprechenden Solenoidventile sind derart angeordnet, daß sie einander benachbart sind und eine untere Stellung einnehmen. Die erste und zweite Öffnung kommunizieren über ein Rohr derart, daß die Achse der ersten Öffnung und die Achse der zweiten angrenzenden Öffnung zur ersten Öffnung in Bezug zur senkrechten Achse (horizontale Achse) geneigt sind.

Fig. 9a zeigt die Verbindung der Solenoidventile 24 bis 26 in einem vergrößerten Maßstab. Es geht aus Fig. 9a hervor, daß die Solenoidventile 24 bis 26 in einer engen Beziehung zueinander angeordnet werden können, ohne daß sich hierdurch die Rohrfittings 241b und 251b, die an den Öffnungen 24b und 25b der Solenoidventile 24 und 25 angeordnet sind, mit den Rohrfittings 251c und 261c kreuzen, die an den Öffnungen 25c und 26c der Solenoidventile 25 und 26 angeordnet sind, und daß die Ventile verbunden sein können, während das Durchhängen der Rohre 10 so gering wie möglich ist. Obwohl die Solenoidventile 24 bis 26 im einzelnen beschrieben worden sind, dürfte es einleuchten, daß die Solenoidventile 20 bis 23, 27 bis 31 und 31' ähnlich miteinander verbunden sein können. Andererseits sind die Öffnungen 24b und 25b, wenn die Ventile 24 bis 26 verbunden sein sollten,

3525673

entlang der vertikalen Linie 1 angeordnet (Winkel im Bezug zur vertikalen Linie ist 0, d.h. in einer Stellung von 6 Uhr) und die Öffnungen 25c und 26c sind entlang einer horizontalen Linie angeordnet (Winkel im Bezug zur horizontalen Linie ist 0, d.h. in einer Stellung von 9 Uhr), wobei die Rohre t erheblich durchhängen würden, obwohl die Solenoidventile 24 bis 26 in enger Beziehung miteinander verbunden sein können.

Der Winkel der Achse der Öffnungen 20b bis 28b in Bezug zur senkrechten Linie kann 60 bis -15° (30 bis 30° in Bezug zur horizontalen Linie) betragen, vorzugsweise in einem Bereich von 45 bis 105° . Wenn die Achsen der Öffnungen 20b bis 28b z.B. bei etwa 45° in Bezug zur senkrechten Linie sind, und die Achsen der Öffnungen 20c bis 28c bei etwa 45° in Bezug zur senkrechten Linie sind, kann das Durchhängen der Rohre t etwas geringer gestaltet werden obwohl die Öffnungen 20b bis 28b in einer etwas höheren Stellung sind, im Vergleich zu der im gezeigten Ausführungsbeispiel. Eine solche Anordnung läßt das Rohr nur geringer durchhängen und der Apparat ist kompakter.

Das Steuerungsmittel 12, welches ein erfindungsgemäßes Merkmal darstellt, wird im folgenden beschrieben. Das Steuerungsmittel 12 umfaßt eine programmierbare Steuervorrichtung 32. Die programmierbare Steuervorrichtung 32 besteht aus Halbleiterelementen, z.B. IC und LSI, die mit magnetischen Kontaktrelais ersetzt sind, welche bei Steuerschaltungen des Standes der Technik verwendet werden. Die programmierbare Steuervorrichtung umfaßt eine arithmetische Steuereinheit 33, eine Speichereinheit (Systemmemory) 35, in der ein Grammer (Systemprogramm) eines arithmetischen Steuerungssystems in der arithmetischen Einheit gespeichert ist, eine

Speichereinheit (Arbeitsspeicher) 34, in welcher ein Arbeitsprogramm gespeichert ist, das derart aufgebaut ist, daß der Benutzer der programmierbaren Steuervorrichtung 32 die Eingangs- und Ausgangssignale mit externen Vorrichtungen empfangen und übertragen kann, wie er es wünscht, sowie mit Eingangs- und Ausgangsvorrichtungen (nicht gezeigt).

Die programmierbare Steuervorrichtung 32 ist mit einer Basensequenzeingabeeinheit 36 verbunden, welche die Basensequenz festlegt.

Die Basensequenzeingabeeinheit 36 umfaßt einen Eingabeschlüssel 37 und einen Mikroprocessor 38.

Die CPU (Zentralverarbeitungseinheit) der arithmetischen Steuereinheit 33 umfaßt z.B. 8061, 8085, 6008-artige IC's. Der Arbeitsspeicher der Speichereinheit 34 umfaßt eine Memoryvorrichtung, z.B. 2 bis 32 k bit ROM, PROM, EPROM und dergl. Die Speichereinheit 34 ist z.B. eine Memoryansammlung und kann entferntbar auf einem Memoryansammlungsempfangsteil (nicht gezeigt) des Gehäuses der programmierbaren Steuervorrichtung 12 befestigt werden. Das verwendete Systemmemory für die Speichereinheit 35 umfaßt 32 bis 96 k bit ROM oder PROM. Ein Timer/Zähler umfaßt einen 30 bis 200 Zähler und die Eingabe/Ausgabemarkierungen sind 20 bis insgesamt 64.

Der Inhalt eines in Fig. 3 gezeigten Fließschemas wird in der Speichereinheit 34 gespeichert. Ein Programm zum Waschen und Trocknen des Gesamtsystems des Syntheseapparats, beginnt bei einem Zustand, daß ein Waschlösungsmittel in entsprechende Flaschen abgefüllt worden ist, und ist ebenfalls gespeichert.

3525678

Eine Memoryansammlungs Vorrichtung, in welcher die Speichereinheit 34 einen Halbleiterspeicher umfaßt, wie z.B. ROM (Read Only Memory), PROM (Programmable Read Only Memory), EPROM (Erasable Programmable Read Only Memory), in denen das andere Vorrichtungssteuerprogramm und/oder Programm für den Produktversiffungstest und den Wartungsbetriebstest gespeichert ist, wird auf den Speicherbehälter derart aufgesetzt, daß die Memoryansammlungs Vorrichtung mit der Speichereinheit der programmierbaren Steuervorrichtung von der Außenseite des Gehäuses ersetzt werden kann. Insbesondere umfaßt das oben erwähnte Programm ein Programm zum Testen des Betriebs des Mikroprocessors 38, ein Programm zum Testen einer Flächenleckage der Solenoidventile 20 bis 31' und der N₂-Strömungsgeschwindigkeit, ein Programm zu Überprüfen, ob die Rohre in geeigneter Weise verbunden sind oder nicht, ein Programm zum Testen der Strömungsmenge des Lösungsmittels, der Reagenzien und Rohmaterialien, sowie ein Programm zum Überprüfen jeglicher der Solenoidventile 20 bis 31'.

Fig. 2 zeigt eine periphere Schaltung der programmierbaren Steuervorrichtung. In den Zeichnungen beschreibt das Bezugszeichen 40 einen Gleichrichter, 41a bis 41m Ausgangsrelais, 42 einen Anfangsschalter, 43 einen temporären Stoppschalter, 44 einen Fortsetzungsschalter, 45 einen Trityl-Abstellschalter, 46 einen Trityl-AUS-Schalter, 46' einen Trityl-AN-Schalter. 46' einen Auffüllschalter, 47 einen Säuberungsschalter, 48 einen Phosphit-Verfahrensschalter, 49 einen Triester-Verfahrensschalter, 50a bis 50n Eingabeeinheiten und 51a bis 51c Ausgabeeinheiten.

Die Ausgaberelais 41a bis 41m sind mit den Solenoidventilen 19 bis 31' verbunden und erregen die

3525678

Solenoidventile 19 bis 31', wenn ihre Kontakte geschlossen sind.

Der Anfangsschalter 42 startet den Betrieb der programmierbaren Steuervorrichtung 32 und des Mikroprocessors 38. Der temporäre Stoppschalter 43 dient dazu, vorübergehend den Betrieb der programmierbaren Steuervorrichtung 32 und des Mikroprocessors 38 anzuhalten. Der Fortsetzungsschalter 44 startet die programmierbare Steuervorrichtung 32 und den Mikroprocessor 38 erneut vom temporären Stoppzustand.

Der Trityl-AUS-Schalter 45 dient dazu, die programmierbare Steuervorrichtung 32 derart zu betreiben, daß die Reaktion unter der Bedingung vollständig abläuft, daß die Schutzgruppe entfernt wird und betätigt die programmierbare Steuervorrichtung 32 derart, daß die Reaktion unter der Bedingung vervollständigt wird, daß die Schutzgruppe hinzugefügt wird.

Die Ausgangsrelais 41n bis q und die Anzeigelampen 54 bis 57 dienen dazu, Detrityl-, Kondensations-, Oxidations- und Kappungsverfahren anzuzeigen.

Der Säuberungsschalter 47 dient dazu, die programmierbare Steuervorrichtung 32 derart zu betreiben, daß Lösungsmittellösungen in die Lösungsmittel-, Reagenz- und Nucleotidreagenz-Flaschen eingefüllt werden und jede Flasche, der Reaktor 11 und die Leitungen gewaschen werden. Der Auffüllschalter 46' dient dazu, die programmierbare Steuervorrichtung 32 derart zu betreiben, daß die Leitungen zwischen den Flaschen 2 bis 11 und den Solenoidventilen 20 bis 28 mit Lösungsmittel und dergleichen gefüllt werden, bevor mit dem Reaktionsbetrieb begonnen wird.

3525678

Die Ausgangsterminals 38a bis 38e und Eingabeterminals 38f bis 38h des Mikroprocessors 38 sind mit den Eingabeeinheiten 50h bis 50l bzw. mit den Ausgangseinheiten 38a bis 38e verbunden. Wenn ein Inkrementsignal von der Ausgangseinheit 51a zum Eingabeterminal 38f erzeugt wird, werden die Daten auf der nächsten Adresse des Speichers des Mikroprocessors 38 auf einer Mikroprocessoranzeige angezeigt und gleichzeitig wird ein Datensignal von Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) von den Eingangsterminals 38a bis 38e zu den entsprechenden Eingabeeinheiten 50h bis 50l ausgegeben. Wenn die Kontrollvorrichtung durch den Anfangsschalter gestartet wird, wird ein Signal von 51b bis 38g eingegeben und die Anfangsadresse des Speichers der Kontrollvorrichtung 32 wird angezeigt, wobei das Datensignal auf der Anfangsadresse bei 50h bis 50l ausgegeben wird. Wenn die Kontrollvorrichtung durch den Fortsetzungsschalter wieder gestartet wird, wird ein Signal von 51c bis 38b ausgegeben und die gegenwärtige Adresse des Speichers der Steuervorrichtung 32 wird angezeigt und das Datensignal wird an 50b bis 50l ausgegeben.

Das Bezugszeichen 52 in den Zeichnungen stellt das Manometer für das N₂-Gas dar.

Fig. 7 ist eine Frontansicht, die die Eingabe und Anzeige des Mikroprocessors 38 zeigt. Der Mikroprocessor 38 ist ausgerichtet, um sowohl als Basensequenzeingabevorrichtung, als auch als Eingabedatenanzeigevorrichtung zu funktionieren, während eine DESIGN-Lampe 101 am rechten und oberen Ende leuchtet und sowohl als Nachschubvorrichtung zur Lieferung der Basensequenzdaten und END-Daten funktioniert, während sie Eingangs- und Ausgangssignale

3525678

mit der programmierbaren Steuervorrichtung und einer Anzeigevorrichtung austauscht, die anzeigt, welche Basen der wachsenden Endgruppe des Polynucleotids gegenwärtig im Reaktor synthetisiert wird.

Eine Adressenanzeige bzw.-display, die n-te Stellung von dem Synthese initiierenden Ende (normalerweise 3'-Ende) des Polynucleotids anzeigt, wird verdichtet und umfaßt zwei Digitalelemente eines 7 Segmentsymbols. Die Anzeigelampen 104 bis 107, die eine der Basen A, G, C, T des Nucleotids anzeigt, das kondensiert werden soll, und die Eingabeschalter 108 bis 111 bestehen aus einem Set. Eine ENDE-LAMPE 112, die ein Ende anzeigt, wo die Synthese aufhört und der ENDE-Eingabeschalter 113 bestehen aus einem Set. Ferner werden ein Schalter 114 zur Bewegung der Adresseanzeige in einer Richtung auf das synthese startende Ende, sowie ein Schalter 115 vorgesehen, zur Bewegung der Adressenanzeige auf das synthese abschließende Ende. Ein Schalter 116 zum Einsatz der Adresse und der Daten, ein Schalter 117 zur Entfernung und ihre Funktionsanzeigelampen 121, 122 werden vorgesehen. Ein Schalter 118 zum Löschen der Adressierungsdaten und zum Löschen der Einsatz- und Streichungsschalter sind vorgesehen, sowie ein Schalter 119 zum Ausdrucken der Basensequenz des Polynucleotids, das gegenwärtig gespeichert ist, sowie ein Schalter 120 zum Überführen des temporären Registers von Adresse, Ende und Basen und dergleichen zu einem Register sowie die Daten der Steuereinheit 12 zum Speicher.

Der Betrieb der eben erwähnten Ausführungsform wird im folgenden in Bezug zum Fließschema der Fig. 3 erläutert.

Ein poröser Glasträger, mit dem Thyminnucleotid (T) verbunden ist, wird in den Reaktor 11 eingeführt. Der

3525678

Stromschalter 39 wird eingeschaltet. Falls die Reaktion gemäß dem Phosphitverfahren durchgeführt werden soll, wird der Phosphitverfahrensschalter 48 gedrückt. Dieses bewirkt, daß die programmierbare Steuervorrichtung 32 das Steuerungsprogramm ausführt, welches auf der linken Spalte in Fig. 3 aufgeführt ist. Eine Heizvorrichtung (nicht gezeigt) wird eingeschaltet und erwärmt den Reaktor 11 auf 20 bis 22 °C. Danach wird eine Wäsche mit einem Lösungsmittel (Acetonitril) durchgeführt.. In dieser Waschstufe wird das Lösungsmittel (Acetonitril) in den Reaktor 11 über dessen Boden von der Flasche 2 eingeführt, welche unter Druck des N₂-Gases durch Öffnung des Solenoidventils 20 steht. Danach wird das in der Leitung übriggebliebene Lösungsmittel in den Reaktor 11 unter Druck des N₂-Gases eingeführt, indem das Solenoidventil 19 geöffnet wird. Die Blasenbildung wird im Reaktor 11 durchgeführt. Während der Blasenbildung werden die Solenoidventile 19, 29 intermittierend geöffnet oder alternativ wird das Solenoidventil 29 intermittierend geöffnet, während das Solenoidventil 19 kontinuierlich offen ist, so daß N₂-Gas, welches unter einem Druck von 0,1 kg/cm² bis 1,0 kg/cm² für 0,02 bis 2,0 sec eingeblasen wird. Das Einblasen wird für eine vorbestimmte Zeitspanne unterbrochen. Diese Stufen werden wiederholt. Intermittierendes Einblasen von N₂-Gas in einer solchen Weise ergibt einen Bewegungseffekt aufgrund der Blasenbildung. Ferner wird die Erzeugung von Nebel und Dampf des Lösungsmittels unterdrückt. Falls die Zeitspanne des N₂-Gas-Einblasens kürzer als 0,02 sec ist, würde der Bewegungseffekt nicht erreicht werden. Falls die Zeitspanne des N₂-Gas-Einblasens länger als 2,0 sec ist, würde sich Nebel bilden. Danach werden die Solenoidventile 29 und 30 in eine Position geschaltet, die durch die gestrichelte Linie dargestellt ist. Das Lösungsmittel wird aus dem Reaktor dadurch

3525678

entfernt, daß das N₂-Gas an der Oberseite des Reaktors 11 eingeblasen wird. Dieser Verfahrensablauf wird mehrmalig wiederholt.

Danach wird die Detritylierungsberührungsstufe durchgeführt. Bei dieser Detritylierungsstufe wird das Detritylagens (3 % Trichloressigsäure/Methylenchloridlösung) aus der Flasche 3 in den Reaktor 11 über dessen Boden eingeführt unter Druck des N₂-Gases indem das Solenoidventil 21 geöffnet wird. Der folgende Verfahrensablauf wird in der gleichen Weise durchgeführt wie die Waschstufe. Der Verfahrensablauf wird mehrfach wiederholt. Während dieser Detritylierungsstufe ist das Solenoidventil 31 geöffnet, um die ablaufende Flüssigkeit zu einem Probenrohr hin zu entleeren, das zu einem Fraktions-sammler führt.

Danach wird wiederum die Waschstufe durchgeführt. Das Verfahren wird dann mit der Kondensationsstufe fortgeführt, abgesehen von dem Fall, wo die ENDE-Eingabe vom Mikroprocessor 38 vorgesehen wird, und der Trityl-AB-Schalter 45 eingeschaltet ist. Die Kondensationsstufe, bei welcher ein Inkrementendruck von der programmierbaren Steuervorrichtung 51a am Mikroprocessor 38 vorgesehen ist, wobei der Fraktionssammler sie überprüft, umfaßt die Stufen eines Kondensationsreagenzes (Tetrazol/ Acetonitril-Lösung), das einer Beladungsstufe (I) nach der Trocknung des Trägers durch N₂-Gas zu geführt wird, eine Nucleotidreagenz(Phosphoramidit)-Beschickungsstufe, eine Kondensationsmittel (Tetrazol/ Acetonitril-Lösung)-Beschickungsstufe (II) und eine Kondensationsreaktionsstufe. Bei der Kondensationsmittel-Beschickungsstufe (I) wird das Kondensationsmittel zur Hälfte der benötigten Menge in den Reaktor 11 eingeführt. Bei der Kondensationsmittel-Beschickungsstufe

3525678

(II) wird das übrige Kondensationsmittel eingeführt. Bei der Nucleotidreagenz(Phosphoramidit)-Beschickungsstufe wird der Verfahrensablauf in Übereinstimmung mit den Instruktionen von der Basensequenzeingabeinheit 36 durchgeführt. Z.B. wird die Nucleotidamidit-Reagenz/Lösungsmittel(Acetonitril)-Lösung von der Flasche 7 zum Reaktor 11 eingeführt, der mit einem Träger beladen ist, der mit Thyminnucleosid (T) versehen ist, indem das Solenoidventil 25 beim ersten Kondensationsverfahren geöffnet wird, wobei das Nucleotidamidit als Base Adenin besitzt, die eine Nucleotidbase mit der zuerst verbundenen darstellt. Als zweite, dritte, vierte, fünfte und n-te Kondensationsstufe werden Nucleotid-Amiditreagenz/Lösungsmittelacetonitril-Lösung in den Reaktor 11 eingeführt, wobei das Nucleotid-Amidit als Base Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T), Adenin (A),Thymin (T) besitzt. Während der Kondensationsreaktion ist es möglich, eine Probe der Reaktionsflüssigkeit aus dem Reaktor 11 zu entnehmen und das Fortschreiten der Reaktion dadurch zu überprüfen, daß die Solenoidventile 29, 30, 31 erregt werden, um die in gestrichelter Linie in Fig. 1 gezeigte Position zu verändern.

In diesem Fall wird die vorherige Adresse und Daten angezeigt, bis ein Inkrementsignal ausgegeben wird. Wenn das Inkrementsignal ausgegeben wird, wird die nächste Adresse angezeigt und die Daten dieser Adresse werden zur programmierbaren Steuervorrichtung 32 ausgegeben.

Zwei, drei und vier Arten von Nucleotidreagenzien können gleichzeitig zum Reaktor 11 zugeführt werden. Wenn n verschiedene Arten an Nucleotidreagenzien zugeführt werden, wird die Öffnungszeitspanne für die Ventile 25 bis 28 auf $n/1$ von derjenigen eingestellt, wenn nur ein Nucleotidreagenz zugeführt wird. Ein dimeres oder ein

3525678

trimeres Nucleotidreagenz kann in eine Rohmaterialflasche beladen werden und danach dem Reaktor 11 zugeführt werden.

Nach Abschluß der oben erwähnten Kondensationsstufe wird eine Oxidationsstufe durch eine Waschstufe durchgeführt. Bei dieser Oxidationsstufe wird ein Oxidationsmittel (jodhaltiges Wasser/Dioxanlösung) in eine Flasche 11 eingeführt, die unter Druck des N₂-Gases steht, indem das Solenoidventil 22 geöffnet wird. Danach wird das Verfahren in der gleichen Weise wie die Waschstufe durchgeführt. Dieser Verfahrensablauf wird mehrfach wiederholt. Nach Vervollständigung der Oxidationsstufe wird das Waschen durchgeführt. Das Verfahren läuft voran bis zur Kappungsstufe, abgesehen von dem Fall, wenn das ENDE-Signal in den Mikroprocessor 38 eingegeben wird, und der Trityl-AN-Schalter 46 eingeschaltet wird. Bei dieser Kappungsstufe wird das Solenoidventil 23 geöffnet, um Kappungsmittel von der Flasche 5 zum Reaktor 11 unter Druck des N₂-Gases zu führen. Danach wird das Verfahren in der gleichen Weise wie die Waschstufe ausgeführt. Dieser Verfahrensablauf kann mehrfach wiederholt werden.

Nach Vervollständigung der Kappungsstufe wird das Verfahren wiederum von der Waschstufe wiederholt. Wenn die Daten bezüglich der Base und des ENDE-Signals an eine neue Adresse des Speichers der Basensequenzeingabeeinheit 36 eingegeben werden, würde der Synthesetrieb abgeschlossen sein, während die Schutzgruppe entfernt oder hinzugefügt wird, nachdem die Synthesereaktion der bestimmten letzten Base abschließt. Wenn die Synthesereaktion aufhören soll, während die Schutzgruppe entfernt ist, wird der Trityl-AB-Schalter eingeschaltet. Wenn die Synthesereaktion abgeschlossen werden sollte,

3525678

während die Schutzgruppe hinzugefügt wird, wird der Trityl-AN-Schalter eingeschaltet.

Es ist ebenfalls möglich, eine Stufe zum Heraustrennen des Polynucleotids aus dem Reaktor 11 nach der Vervollständigung des Syntheseverfahrens durchzuführen. Eine Reagenzflasche für die Heraustrennungsstufe kann vorgesehen werden. Die Heraustrennungs- bzw. Abtrennungsstufe ist jedoch kein Wiederholungsschritt, so daß dieser Schritt eine lange Zeitspanne zur Durchführung benötigt und die Wirksamkeit nicht hoch ist.

Wenn die Reaktion nach dem Triester-Verfahren durchgeführt wird, kann die Reagenzflasche 4 leer sein, da das Oxidationsagens nicht verwendet wird, ungleich dem Phosphit-Verfahren. Alternativ kann die Reagenzflasche als Lösungsmittelflasche 4 verwendet werden und ein Lösungsmittel II enthalten, welches in der Flasche 2 enthalten ist oder ein abweichendes Lösungsmittel II. Andere Beispiele, in den abweichende Lösungsmittel verwendet werden, werden im folgenden beschrieben. Der Triester-Verfahrensschalter 49 wird eingeschaltet. Dieses bewirkt, daß der Steuerungsinhalt, der in der rechten Spalte der Fig. 3 angegeben ist, durch die programmierbare Steuervorrichtung 32 ausgeführt wird. Wenn Polystyrolgel als Träger verwendet wird, ist eine Quellstufe erforderlich. Der Träger wird mit einem Flüssigkeitsgemisch aus Methylenchlorid/Methanol (Lösungsmittel I) angeschwellt bzw. gequellt. Das Verfahren ist identisch zum Phosphit-Verfahren, abgesehen davon, daß die Oxidationsstufe nicht benötigt wird. Bei der Waschstufe nach der Detritylierung wird der Träger mit dem Flüssigkeitsgemisch Methylenchlorid/Methanol einmal gewaschen und danach mit Tetrahydrofurananhydrid-

Lösungsmittel zweimal gewaschen und danach mit N₂-Gas getrocknet. Tetrahydrofurananhydrid wird zum Waschen nach der Kondensationsstufe verwendet. Das Flüssigkeitsgemisch Methylen/Methanol wird verwendet zum Waschen nach der Kappungsstufe.

Der temporäre bzw. zeitweilige Stoppschalter 43 wird eingeschaltet oder der Betrieb der programmierbaren Steuervorrichtung 32 wird angehalten aufgrund Stromversagens, während die Synthese durchgeführt wird, wobei der Zustand kurz vor Einschalten des Schalters 43 oder Stromversagens aufrechterhalten wird. Der Betrieb wird fortgeführt, wenn der Fortsetzungsschalter 46 eingeschaltet wird oder wenn der Strom wieder fließt.

Bei der eben erwähnten Ausführungsform werden die Solenoidventile 20 bis 28 lediglich am Auslaß der Flaschen 2 bis 10 vorgesehen, so daß der Druck des N₂-Gases normalerweise an den Flaschen 2 bis 10 anliegt. Dementsprechend tritt eine Abnahme des Druckes selten auf, sogar wenn das N₂-Gas etwas aus den Flaschen 2 bis 10 austritt. Der Flüssigkeitsnachschub wird gleichzeitig mit der Öffnung der Solenoidventile 20 bis 28 durchgeführt.

Da Rückschlagventile 16, 17 und 18 an den Auslässen der Flasche 3, die das Detritylagens enthält, der Flasche 4 des Lösungsmittels II bzw. der Flasche 5 des Kappungsreagenzes, vorgesehen sind, tritt die Gefahr nicht auf, daß der Dampf der Nebel dieser Reagenzien die Leitung die Leitung 14 entgegenströmt, um in die anderen Flaschen einzutreten.

Im Fall, daß Solenoidventile anstelle der Rückschlagventile 16, 17 und 18 vorgesehen werden, sind sie derart

ausgerichtet, daß sie gleichzeitig mit dem Öffnen der Solenoidventile 21, 22 und 23 geöffnet werden, wobei etwas N_2 -Gas aus den Flaschen 3, 4 und 5 austritt, was einen Druckabfall bewirken würde.

Der Flüssigkeitsnachschieb würde ausgeführt werden, nach Druckerhöhung, wenn die Solenoidventile geöffnet sind. Wenn die Strömungsgeschwindigkeit ansprechend zur Öffnungszeit der Solenoidventile gesteuert wird, treten die Nachteile, wie ein Absacken der Strömungsgeschwindigkeit, auf. Ein Filter wird am Auslaß der entsprechenden Flasche zum Ventil vorgesehen, wodurch eine Leckage aufgrund der Einführung fremden Materials in das Ventil verhindert wird.

Das Solenoidventil 31' ist ein Vorschnittventil, das verwendet wird, wenn geringe Leckagen in den Flaschen 20 bis 31 auftreten sollten, oder wenn es gewünscht ist, die Möglichkeit von Leckagen in den Ventilen 20 bis 30 zu eliminieren oder, wenn irgendein Faktor die Ausbeute verringert, z.B. der Einfluß einer Verschlechterung des Reagenzes im Verlauf der Synthese eines sehr langen Polymers. Wenn die Flüssigkeit an einigen Punkten im Reaktionsverlauf zum Reaktor geführt wird, kann eine anfängliche vorbestimmte Menge von 0,1 bis 0,5 ml der Flüssigkeit aus dem System entleert werden, ohne daß sie in den Reaktor eingeführt wird. Wenn die Ventile 20, 30 und 31' gleichzeitig in der Weise verändert werden, die in der gestrichelten Linie dargestellt sind, indem sie eingeschaltet werden, ist das System geschlossen, während es mit N_2 -Gas gefüllt wird. Die Leckage in den Solenoidventilen 20 bis 28 kann verhindert werden aufgrund des Wegfalls eines Differenzdrucks zwischen der jeweiligen Öffnung in den Solenoidventilen 20 bis 28 während dieser Zeit.

3525678

Fig. 6 zeigt eine weitere Ausführungsform der Basensequenz-Eingabeeinheit 36, in der ein Drehschalter 53 und eine Programmanzeige mit druckknopfartigen Diodenschaltern zusammen mit einem Mikroprocessor 38 verwendet werden.

Eines der Ausgangsrelais der programmierbaren Steuervorrichtung wird eingeschaltet, wenn Nucleotid zugeführt wird. Der bewegliche Kontakt 53k des Drehschalters 53, der betriebsmäßig mit dem Relais verbunden ist, wird sukzessiv auf die stationären Kontakte 53a bis 53j geschaltet. Bei der ersten Synthesereaktion wird das Solenoidventil 25 geöffnet, so daß ein Nucleotid (mit Adenin (A) als Base) Reagenz/Lösungsmittellösung zum Reaktor 11 zugeführt wird. Bei der zweiten Synthesereaktion werden die Solenoidventile 26 und 28 geöffnet, so daß das Nucleotid (mit Guanin (G) als Base) Reagenz und Nucleotid (mit Thymin (T) als Base) Reagenz zum Reaktor zugeführt werden. Als dritte Synthese wird das Solenoidventil 27 geöffnet, so daß das Nucleotid mit Cytosin (C) als Base) zum Reaktor zugeführt wird. Bei der eben erwähnten Ausführungsform werden sämtliche Reagenzien einschließlich Kondensationsagens und Nucleotidreagenz automatisch zum Reaktor 11 zugeführt. Der Apparat kann jedoch derart verändert werden, daß das Kondensationsagens und das Nucleotidreagenz manuell eingespritzt werden. In diesem Fall ist die Basensequenz-Eingabeeinheit 36 nicht notwendig.

Der vorliegende Apparat kann zur Synthese von RNA sowie zur Synthese von DNA verwendet werden.

Da die Flüssigkeitsnachschieb- und Entleerungsmittel (Solenoidventile 19 bis 31) entsprechend den gespeicherten Inhalten einer Speichereinheit gesteuert werden,

3525678

mittels einer programmierbaren Steuervorrichtung, einschließlich Speichereinheit, in der die Nachschubmenge der Flüssigkeiten, z.B. Reagenz, Lösungsmittel und dergleichen, sowie Flüssigkeitsnachschub- und Entleerungs-Reihenfolgen gespeichert sind, wie oben erwähnt worden ist, sind keine Schnittstellen erforderlich und der Einbau der auf dem Gehäuse befestigten Steuervorrichtung ist nicht notwendig, wodurch sich eine Verringerung der Kosten und der Größe des Gesamtapparates ergibt bzw. überhaupt ermöglicht wird. Ferner benötigt der erfindungsgemäße Apparat keinen unnötig komplizierten Betriebsablauf und keine lange Wartezeit aufgrund der Tatsache, daß zuviele Eingabedaten und Auswahlzweige vorliegen, die bei Apparaten mit eingebautem üblichen Mikrocomputer auftreten. Sogar ein Anfänger kann den erfindungsgemäßen Apparat leicht bedienen.

Ferner können die Steuerinhalte leicht verändert werden, indem man die gespeicherten Inhalte in der Speichereinheit oder die festgelegten Inhalte in der Basensequenzeingabeeinheit verändert, wodurch die Betriebsfähigkeit verbessert wird.

Wenn die Basensequenzeingabeeinheit einen Mikroprocessor umfaßt, kann im wesentlichen die gleiche Funktion erreicht werden, wie bei denjenigen der Gesamtsteuervorrichtung, die einen Mikrocomputer umfassen, so daß eine Kostenreduzierung erreicht werden kann. Der Mikroprocessor, der lediglich die Basensequenzeingabeeinheit bildet, kann nicht nur aus wirtschaftlichen Halbleiterelementen bestehen, sondern die Tastatur umfassen, welche kompakt und wirtschaftlich ist. Ferner kann der Apparat verwendet werden, ohne daß die Spezifikation geändert wird, unabhängig von der Modifikation der

3525678

Hauptsteuereinheit oder des Arbeitsspeichers und Veränderung im Apparatetyp, wobei der erfindungsgemäße Apparat besonders wirtschaftlich auf die Verbesserungen der Apparateart und der chemischen Reaktion anspricht.

Nummer:

Int. Cl.4:

Anmeldetag:

Offenlegungstag:

35 25 678

C 07 H 21/00

18. Juli 1985

30. Januar 1986

FIG. 1

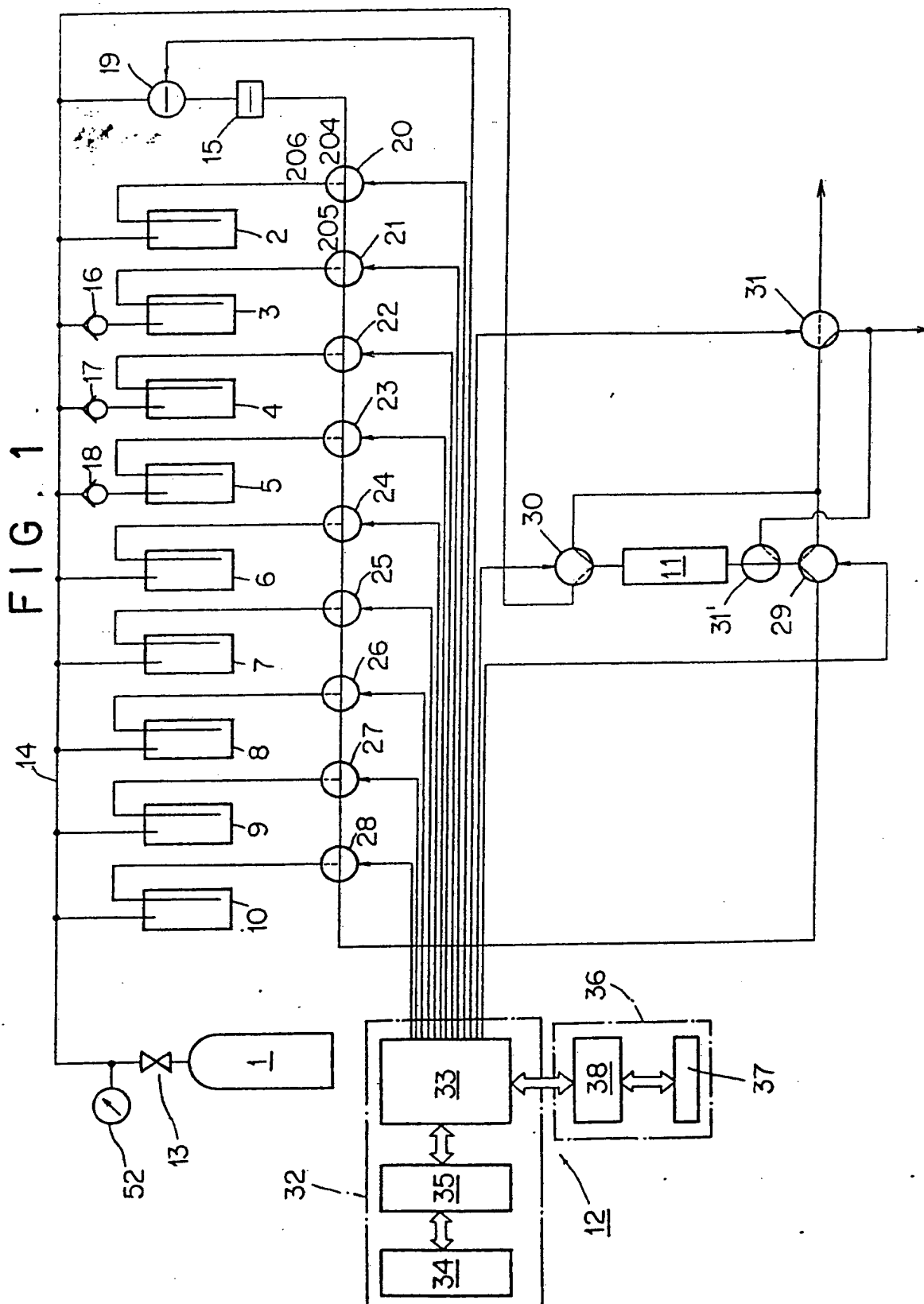


FIG. 2

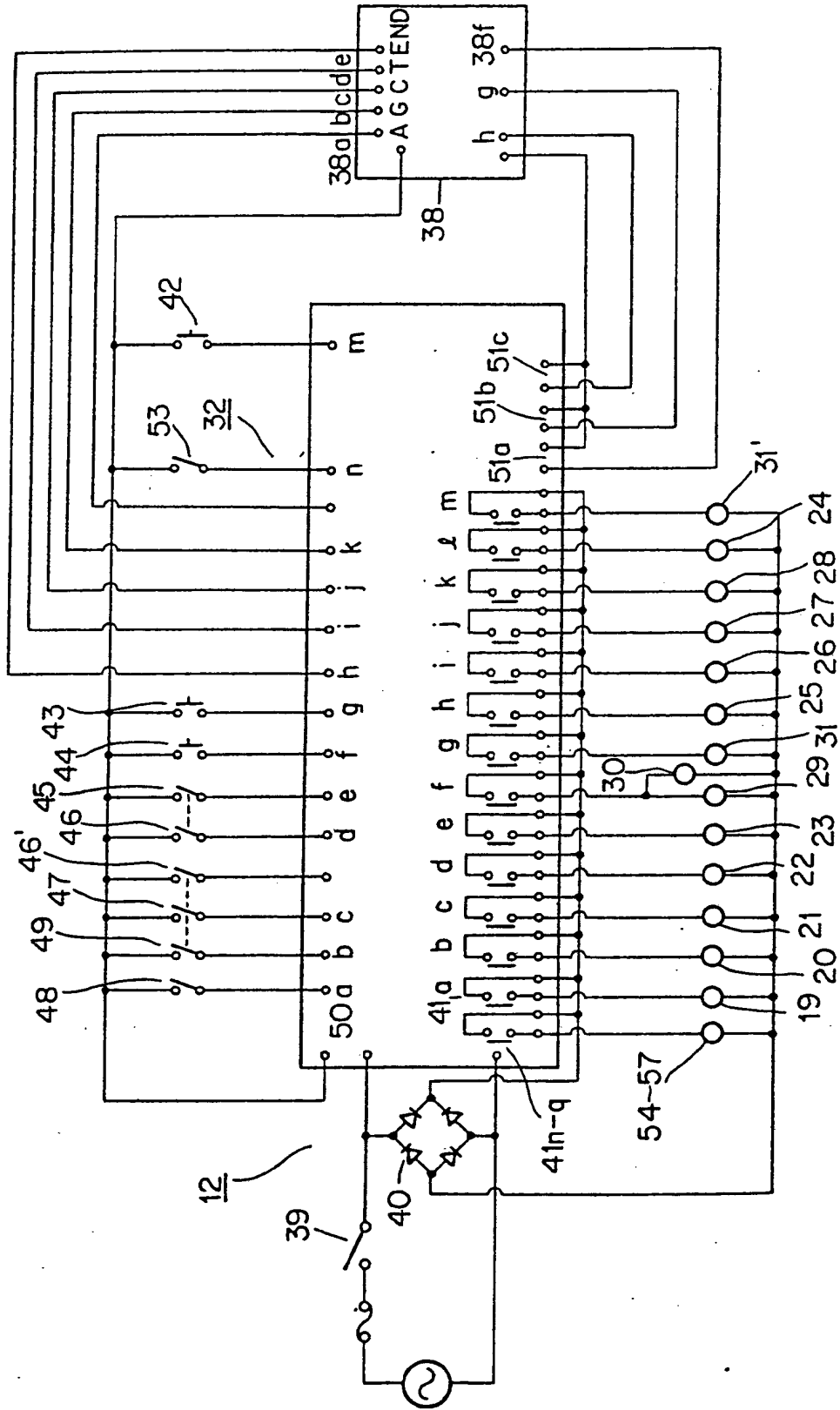


FIG. 3

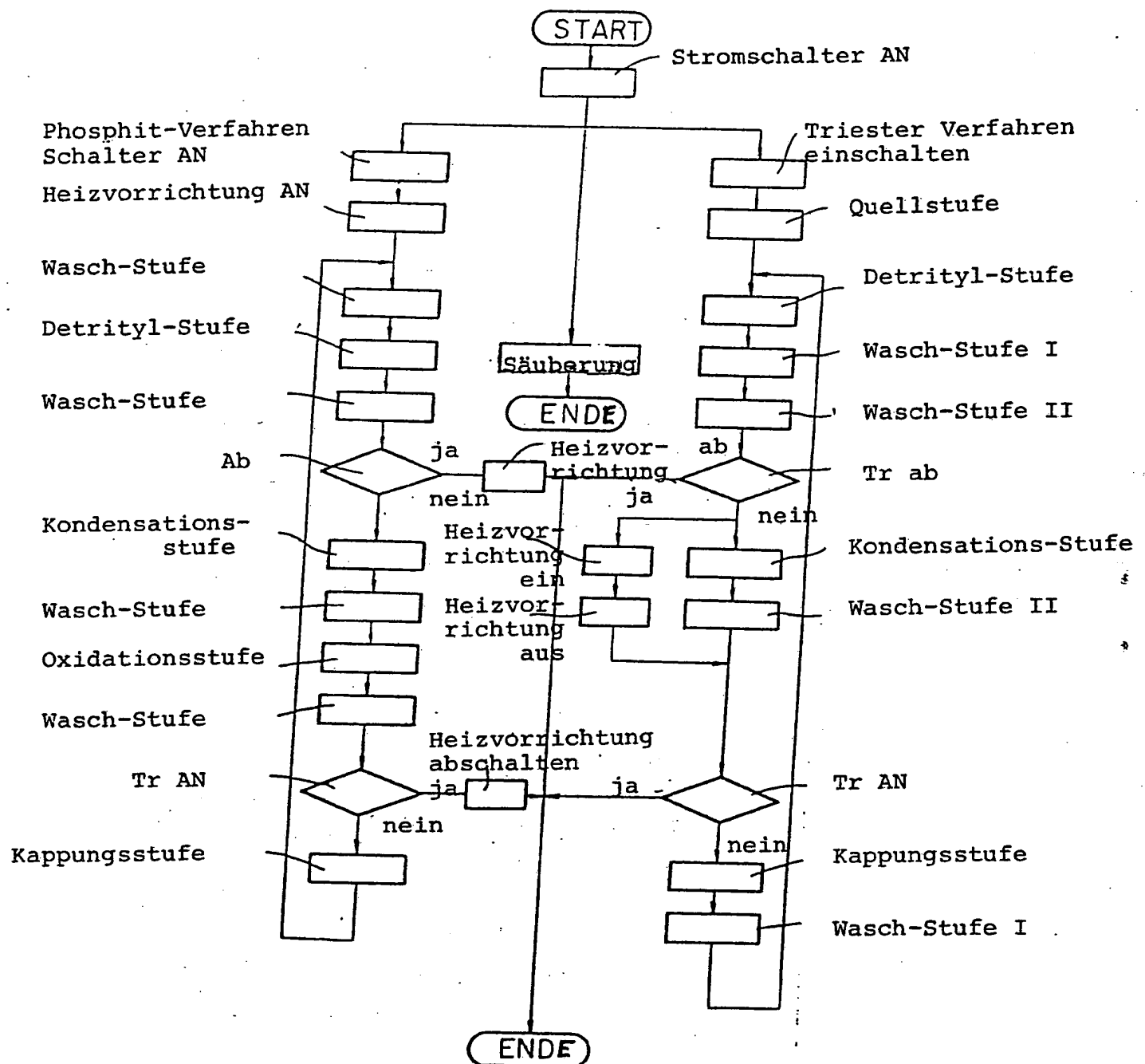


FIG. 4

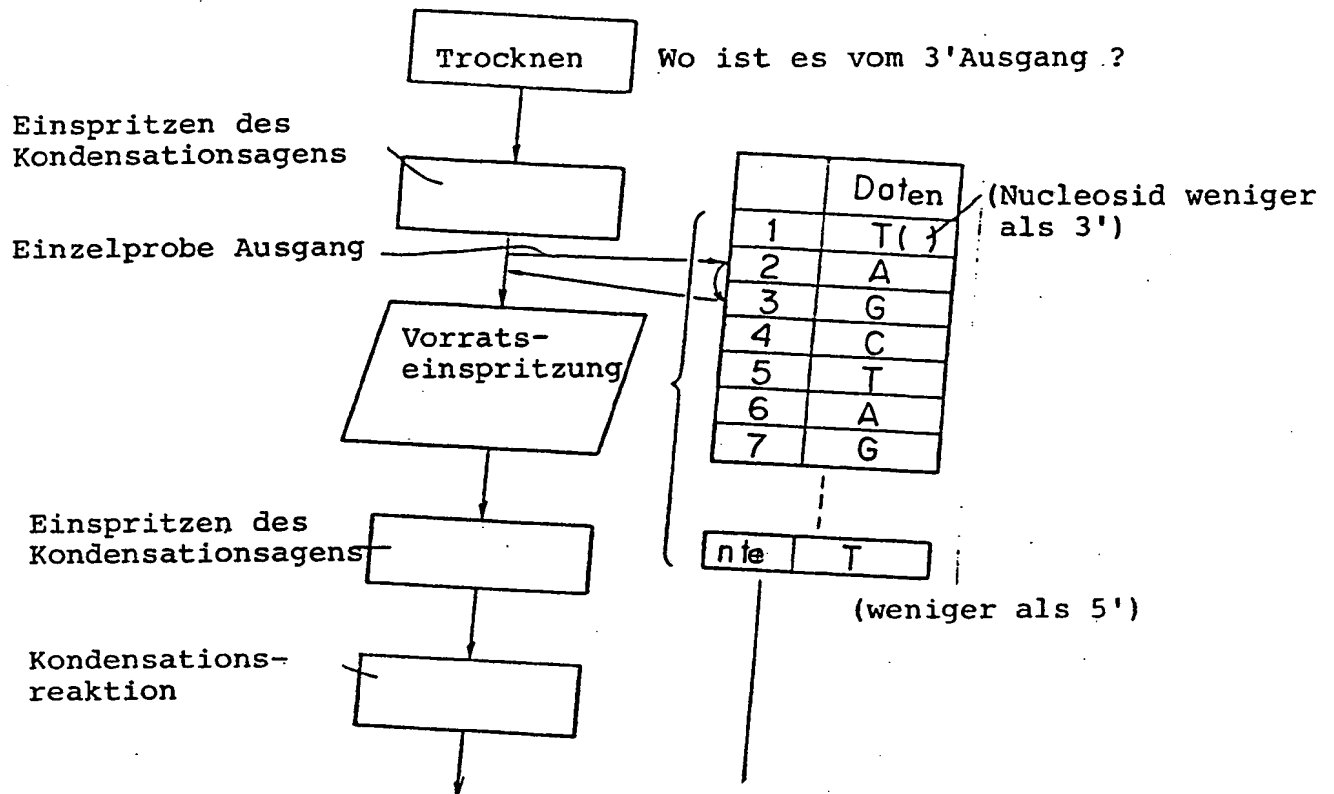


FIG. 5a

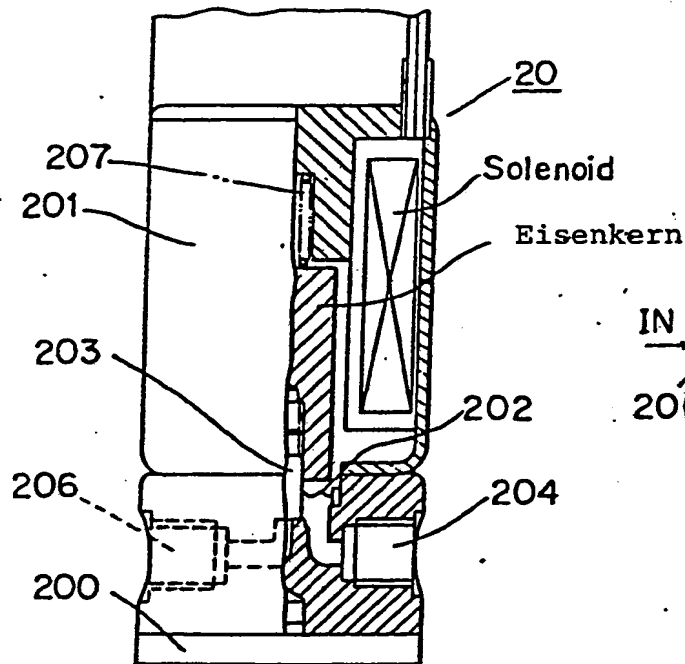


FIG. 5b

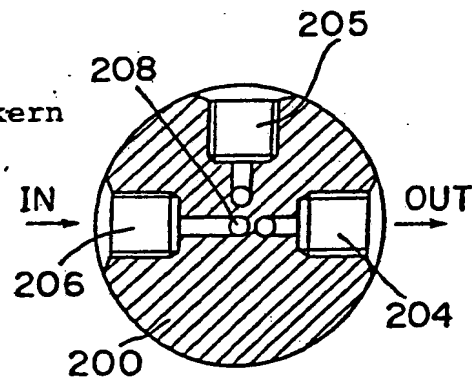


FIG. 6

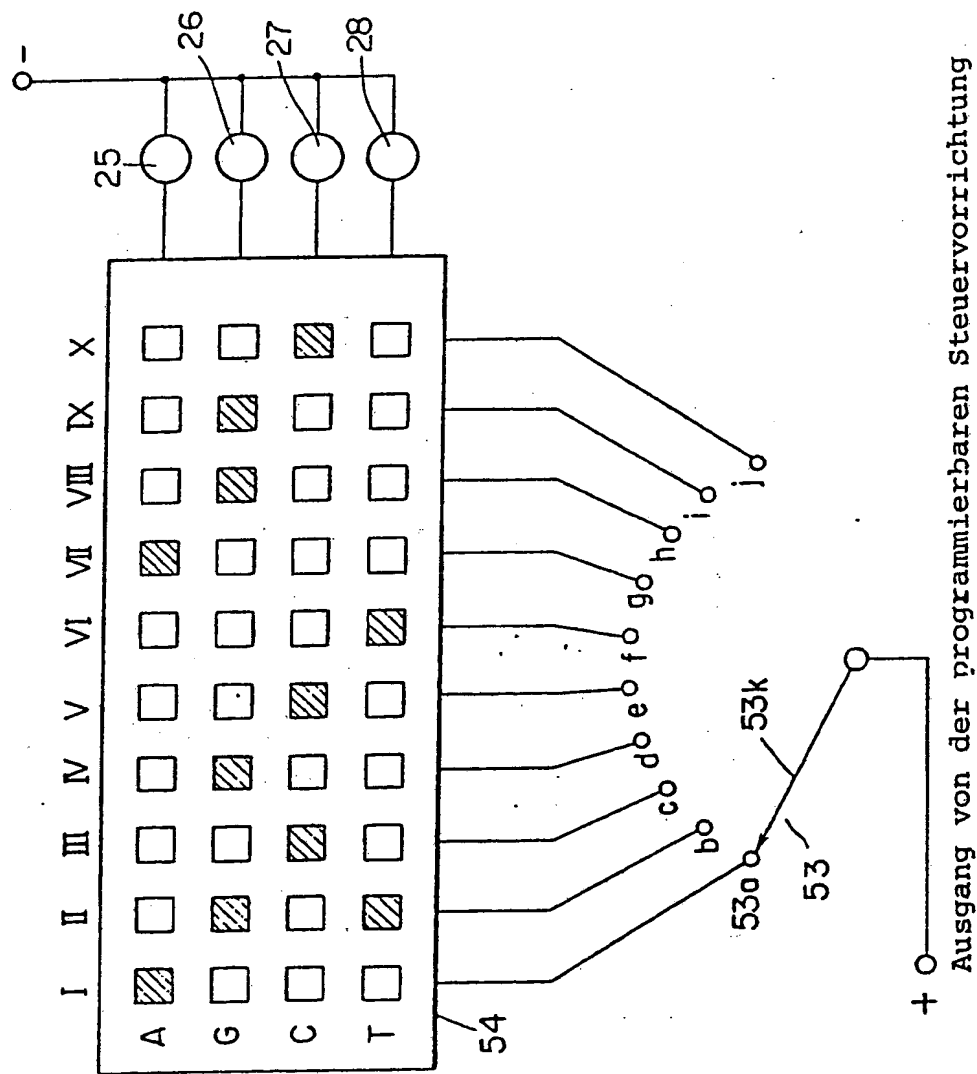


FIG. 8

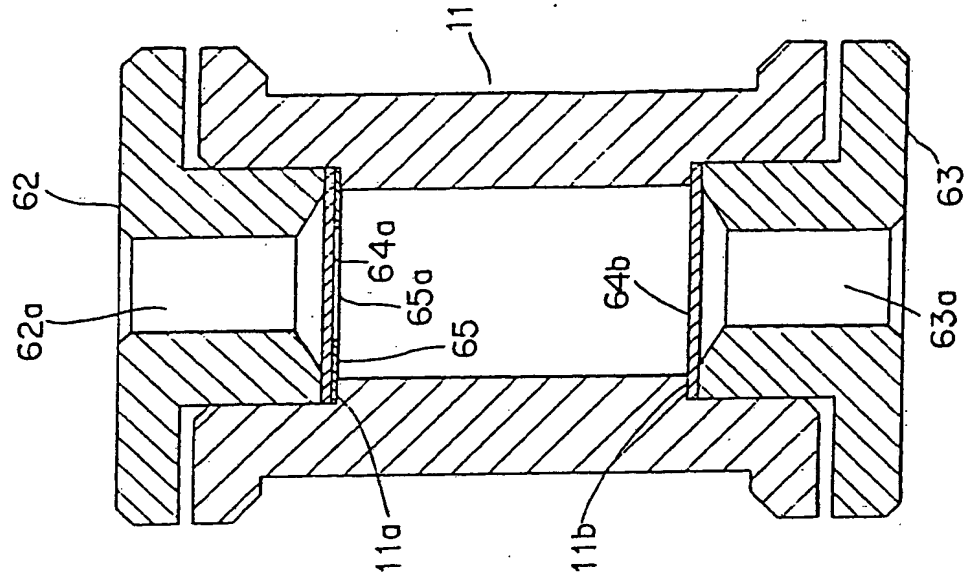


FIG. 7

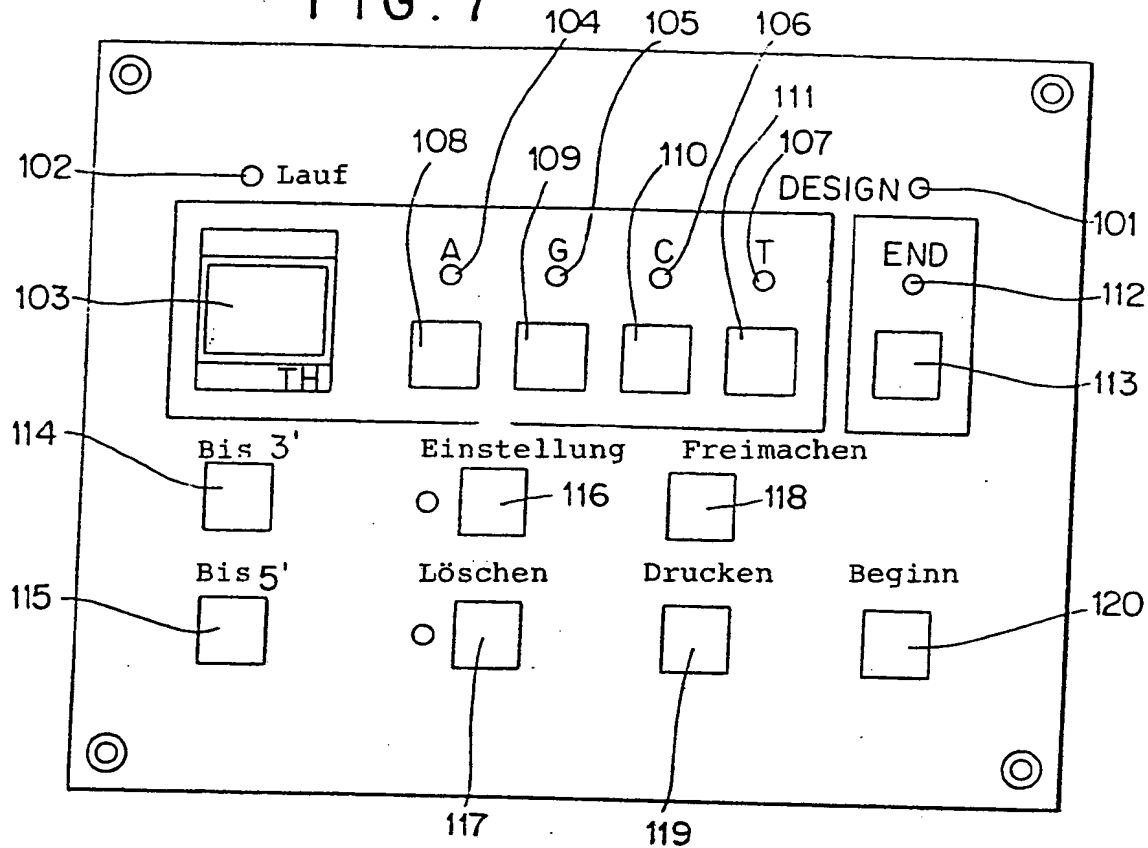


FIG. 9a

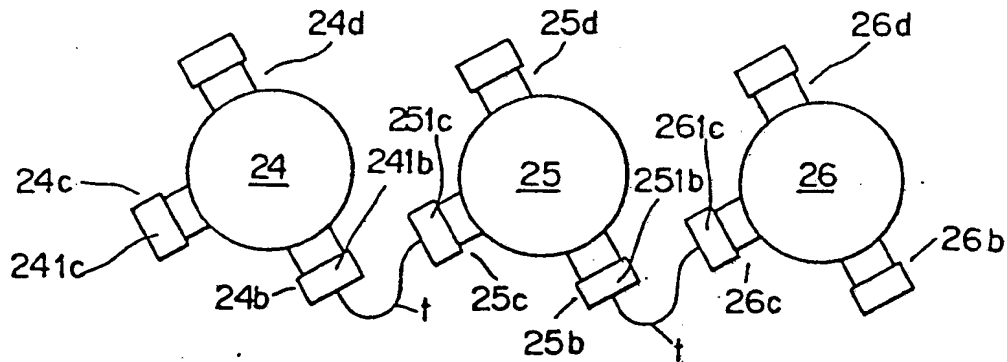


FIG. 9b

